

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 07-170976

(43) Date of publication of application : 11.07.1995

(51)Int.Cl. C12N 9/06
C12Q 1/26
// C12N 1/21
C12Q 1/28
(C12N 9/06
C12R 1:19)
(C12N 1/21
C12R 1:19)

(21)Application number : 05-316951

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22) Date of filing : 16.12.1993

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIAKI
TEJIMA SHINICHI
KAWAMURA YOSHIH

(54) NOVEL ENZYME HAVING N-METHYLVALINE OXIDASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel N-methylvaline oxidase which is useful in determination of N-methylvaline.

CONSTITUTION: This oxidase acts on N-methylvaline in the presence of water and oxygen to form valine, formaldehyde and hydrogen peroxide where the substrate specificity is 100% for N-methylvaline and less than 1% for sarcosine, the optimal pH is 7-9, the optimal temperature is 40 to 50°C, and the molecular weight is 43kd. The enzyme is obtained by substituting another amino acid (preferably valine) for phenylalanine at No.103 in the amino acid sequence of a gene given in the formula of the protein having the sarcosine oxidase activity.

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
 1 5 10
 Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Ile Ser Lys Glu Gly Val Lys Tyr
 20 25 30
 Lys Lys Val Asp Ser Pro His Ile Pro Val Ile Thr Asp Gly Ser His Ala
 35 40 45

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Glu Leu Ala Val Thr Gly Lys
 395 396 397 398
 Ile Gln His Asn Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 399 400

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-170976

(43)公開日 平成7年(1995)7月11日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内登録番号	P I	技術表示箇所
C 12 N 9/06	ZNA B			
C 12 Q 1/26		6807-4B		
// C 12 N 1/21		8828-4B		
C 12 Q 1/28		6807-4B		
(C 12 N 9/06				

審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 平成5年(1993)12月16日	(71)出願人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
	(72)発明者 西矢 芳昭 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
	(72)発明者 手嶋 真一 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
	(72)発明者 川村 勇久 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54)【発明の名称】 N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素

(57)【要約】

【目的】N-メチルバリンの測定に有用であるN-メチルバリンオキシダーゼを提供する。

【構成】ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を蛋白工学的手法により改変したN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素およびその製法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用して、パリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成することを特徴とするN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素。

【請求項2】 下記理化学的性質を有する請求項1記載のN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素。

作用：水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用して、パリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

基質特異性：N-メチルパリン 100%

ゲルコシン ♂1%

至適pH：7～9

至適温度：40～50℃

分子量：43Kd

【請求項3】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンがパリンに置換されたことを特徴とする請求項1記載のN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素。

【請求項4】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列のフェニルアラニンを他のアミノ酸に置換することを特徴とするN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法。

【請求項5】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンをコードする遺伝子を部位特異的に変異させることにより、他のアミノ酸に置換して、N-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する酵素を製造することを特徴とする請求項4に記載されるN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法。

【請求項6】 他のアミノ酸がパリンであることを特徴とする請求項4または5記載のN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法。

【請求項7】 調体中のN-メチルパリンに、水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用して、パリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素を作用させ、消費する酸素または生成するパリン、ホルムアルデヒドあるいは過酸化水素を測定することを特徴とするN-メチルパリンの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素、その製造法およびその用途に関する、特にザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を変更することにより得られたN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素、その製造法およびその用途に関する。

【0002】

2

【従来の技術】 N-メチルパリンに作用して過酸化水素を生成する酵素は、未だ自然界から見い出されていず、また人工的にも生産されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はN-メチルパリンの測定に有用であるN-メチルパリンオキシダーゼを求めるべく、脱酰検討していたところ、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を蛋白工学的手法により改変し、N-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素を造成することを見出した。

【0004】

【課題を解決するための手段】 すなわち本発明は水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用して、パリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成することを特徴とするN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素である。

【0005】 また本発明はザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列のフェニルアラニンを他のアミノ酸に置換することを特徴とするN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法である。具体的には、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンをコードする遺伝子を部位特異的に変異させることにより、他のアミノ酸に置換して、N-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する酵素を製造することを特徴とする。

他のアミノ酸としてはパリンが好ましい。

【0006】 さらに本発明は液体中のN-メチルパリンに、水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用してパリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素を作用させ、消費する酸素または生成するパリン、ホルムアルデヒドあるいは過酸化水素を測定することを特徴とするN-メチルパリンの定量法である。

【0007】 水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用して、パリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する本発明の酵素の具体例としては、下記理化学的性質を有する酵素が挙げられる。作用：水および酸素の存在下でN-メチルパリンに作用して、パリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

基質特異性：N-メチルパリン 100%

ゲルコシン ♂1%

至適pH：7～9

至適温度：40～50℃

分子量：43Kd

【0008】 さらに具体的な例としては、アミノ酸配列が配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンがパリンに置換されたN-メチルパリンオキシダーゼ活性を有する新規なタンパク質が挙げられる。

【0009】本発明の新規な酵素は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列のうちフェニルアラニンを他のアミノ酸に置換して、製造される。

【0010】本発明に使用されるザルコシンオキシダーゼとしては、例えばパチス菌、コリネバクテリウム菌、アースロバクター属のザルコシンオキシダーゼなどがあり、特に限定されないが、本発明の実施例においては、アースロバクター・エスピーテ E 1826 のザルコシンオキシダーゼ (Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)に記載) を用いた。

【0011】ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を見換える手法が用いられる。すなわち、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を交換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAが作成される。

【0012】DNA中の塩基を交換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (TransformerTM ; Clonetech 製, T7-GEN in vitro mutagenesis kit ; Stratagene 製) の使用、或いはPCR法の利用が挙げられる。

【0013】具体的にはまず親タンパク質を产生する細胞から染色体DNAを分離する。得られた染色体DNAを制限酵素、例えばSau3AIで部分分解させ、断片に分離した後、同じ制限酵素で切断したプラスミドとDNAリガーゼによりDNAを連結する。連結したDNAはエシュリヒア・コリーのコンビテントセルを用いて形質転換する。得られたコロニーは培地で培養し、遺伝子が挿入された組換えDNAをスクリーニングする。次いで挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断して他のプラスミドにサブクローニングし、挿入DNA断片を有するプラスミドを得る。恒常のサブクローンは常法に従い、SEQUENASE VERSION2.0 7-deaza-d GTP kit(東洋紡織製)を用いて、配列決定を行う。

【0014】次いでフェニルアラニンをコードする塩基を他のアミノ酸をコードする塩基に置換したオリゴスクレオチドおよびTransformerTM(Clontech 製)を用い、TransformerTMのプロトコールに従い、フェニルアラニン残基が他のアミノ酸、好ましくはバリンに置換された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAを作成する。

【0015】作成された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えばエシュリヒア・コリーを宿主微生物とする場合には、pBluescript, pUC18などが使用できる。

【0016】宿主微生物としては、例えばエシュリヒア

・コリー W3110、エシュリヒア・コリーC600、エシュリヒア・コリーJM109、エシュリヒア・コリーDH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシュリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。

【0017】こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養を行うが、工業的には通気搅拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては質化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、蜂蜜、ビルピン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、

酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0018】培養温度は菌が発育し、改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシュリヒア・コリーの場合、好ましくは28~42°C程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0019】培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は通過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物を通過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0020】この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を例えば凝固濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等温点処理も有効な精製手段である。吸着剤あるいはグル波過剤などによるグル波過、吸着クロマトグラフ

イー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーにより、精製されたN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質を得る事ができる。

【0021】本発明のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素は、検体中のN-メチルバリンオキシダーゼに水および酸素の存在下で作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成させる。次いで消費する酸素量または生成するアリン、ホルムアルデヒドあるいは過酸化水素を測定することによりN-メチルバリンを定量することができる。検体としては、アミノ酸誘導体合成中間物、医薬品合成中間物、N-メチルアミノ酸研究試料等が挙げられる。

【0022】消費する酸素の測定法としては、酸素電極を利用する方法などがある。また生成したバリンを測定する方法としては、アミノ酸分析計を用いる方法などがある。さらに生成するホルムアルデヒドを測定する方法としては、ホルムアルデヒド脱水素酵素を利用する方法などがある。生成する過酸化水素を測定する方法としては、従来から公知の方法を使用すればよく、例えばベルオキシダーゼと4-アミノアンチビリンとフェノール誘導体またはアニリン誘導体を使用する方法などがある。フェノール誘導体としては、フェノール、2,4-ジクロロフェノール、p-クロロフェノールなどが挙げられる。アニリン誘導体としては、ジメチルアニリン、ジエチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンなどが挙げられる。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、酵素特性を示す指標であるK_m、k_{cat}を求める際のN-メチルバリンオキシダーゼ活性またはザルコシンオキシダーゼ活性の測定は以下のようになつた。すなわち、45mMトリス緩衝液(pH8.0)、任意の濃度の基質(N-メチルバリンまたはザルコシン)、0.47mM4-アミノアンチビリン、2.0mM フェノール、0.04%トリトンX-100、4.5U/ml ベルオキシダーゼ中で酵素を37°C、10分反応させ、500nmにおける吸光度を測定する。

【0024】実施例1 N-メチルバリンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAの作成
ザルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体プラスミド、pSAOEP3は以下の方法により作成した。アースロバクター・エスピーテE1826(微生物研菌寄第10637号)の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100mlの2×YT培地(1.6%ポリペプトン、12酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))で37°C一晩振盪培養後、遠心分離(8000 rpm、10分)により集菌した。15mMクエン酸ナトリウム、0.1%塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュークロース、1mMEDTAで

A. 50mMトリス塩酸(pH 7.6)を含んだ溶液5mlに懸濁させ、0.5mlのリゾチーム溶液(100mg/ml)を加えて37°C、30分間保温した。次いで1mlの1%ラウロイルサルコシン酸、0.1mMEDTA(pH9.6)を含む溶液を加えた。この懸濁液に臭化エチシウム溶液を0.5%、塩化セシウムを約1000倍加え、搅拌混和し、55,000rpm、20時間の超遠心でDNAを分取した。分取したDNAは、10mMトリス塩酸(pH8.0)、1mMEDTAを含んだ溶液(TE)で透析し、精製したDNA標準とした。エシメリヒア・コリーJM109のコンビントセルはHanahanの方法により作成し、ライブラリー作成の宿主として用いた。

【0025】染色体DNA 1μgを制限酵素Sau3A(東洋紡製)で部分分解反応させ、2kb以上の断片に分解した後、SalI(東洋紡製)で切断したpUC18 0.5 μgとM.G.LoftusらのBACKFILLING法(Biotechniques Vol12, No.2(1992))に従い、T4-DNAリガーゼ(東洋紡製)1ユニットで37°C、12時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシメリヒア・コリーJM109のコンビントセルを用いて形質転換した。使用したDNA 1μg当たり約1×10⁸個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50μg/mlアンビシリソ、0.5%ザルコシン、0.005%ラロースアニリン及び0.025%ソディウムハイドロジエンザルファイト入りし培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)で37°C、18時間培養し、赤色コロニーを指標にザルコシンオキシダーゼ遺伝子の入った組換えDNAをスクリーニングした。その結果約1,000個のコロニーのうち1株の部で赤色を示すコロニーを得た。この中の1株が保有するプラスミドには約8.7kbpの挿入DNA断片が

存在しており、このプラスミドをpSAO1とした。次いでpSAO1より挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断してpUC18にサブクローニングし、約1.7kbpの挿入DNA断片を有するpSAOEP3を得た。

【0026】pSAOEP3の約1.7kbpの挿入DNA断片について種々の制限酵素で切断してサブクローンを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、SEQUENASE VERSION2.0 7-deaza-dGTP kit(東洋紡製)を用いて、DNA配列の決定を行つた(配列表・配列番号2)。該DNA配列から決定したアミノ酸配列を配列表・配列番号1に示した。次いで、配列表の配列番号3のオリゴヌクレオチドとTransformerTM(Clontech製)を用い、TransformerTMのプロトコールに従い、配列表の配列番号1記載の第103番目のフェニルアラニンがバリンに置換された改変タンパク質(F103V)の遺伝情報を有するDNAを作成した。F103Vの遺伝情報を有するDNAを保持する組換え体プラスミドを、pSAOEP3-F103Vと命名した。(図1参照)

【0027】実施例2 形質転換体の作成
プラスミド、pSAOEP3-F103Vでエシメリヒア・コリーJM109のコンビントセルを水中30分間接触後、42°C

で45秒間ヒートショックを行うことにより形質転換し、形質転換体JM109(pSADEP3-F103V)を得た。

[0028] 実施例3 形質転換体の培養と改変タンパク質の精製

2×YT培地(1.6% ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム(pH7.2))50mlを500mlフラスコに分注し、121°C、15分間オートクレーブを行い放冷後、別途 無菌過した50mg/mlアンピシリン(ナカライテスク製)を0.1%添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め37°Cで18時間振盪培養した形質転換体(JM109(pSA 10 OEP3-F103V))の培養液1mlを接種し、37°Cで通気搅拌培養した。培養液より改変タンパク質(F103V)を、

菌体破砕、除核酸、培析後、イオン交換カラムクロマト*

基 質	アースロバクター-エスピ-TE1823 由来ザルコシンオキシダーゼ			F103V		
	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	Km/kcat	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	Km/kcat
ザルコシン	3.6	14	3.9	120	5.3	0.044
N-メチルバリン	110	7.9	0.072	1.2	5.5	4.6

* グラフィーを実施することにより(Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)参照)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて単一のバンドを形成するまで精製した。精製タンパク質の分子量は43Kd、至適pHは7~9、至適温度は40~50°Cであった。

[0029] 精製された改変タンパク質(F103V)とアースロバクター-エスピ-TE1826のザルコシンオキシダーゼ(東洋紡績製)のKm、kcat測定値

[0030]

【表1】

[0031] 改変タンパク質(F103V)の特性は、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有することである。酵素の反応性を示す指標であるkcat/Kmを見ると、ザルコシンオキシダーゼはザルコシンに対する反応性がN-メチルバリンの反応性の約54倍であるのに對し、改変タンパク質(F103V)はN-メチルバリンに対する反応性がザルコシンに対する反応性の約10※30

試薬

トリス緩衝液(pH8.0)	5.0 mM
F103Vまたはザルコシンオキシダーゼ	0.1 mg/ml
4-アミノアンチビリン	0.42 mM
フェノール	1.8 mM
ペルオキシダーゼ	4.7 U/ml

[0033] 測定方法

N-メチルバリン水溶液2 mM(100 mMトリス緩衝液(pH8.0)にて溶解)の1.0段階希釈液を検体とし、各100 μlを採取し、これに上記試薬3 mlを加えて30°Cで3分間反応させて、500 nmにおける吸光度を求めた。なお、プランクはN-メチルバリン含有被検液の代わりに蒸留水を用いた。図1に検体の着色直線性を示した。図1より明らかなように、本発明のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素を用いることにより、短時間に正確かつ簡単にN-メチルバリンを測定することができる。ザルコシンオキシダーゼを使用すると、感度不足でN-メチルバリンを測定できなかった。

[0034]

※5倍であった。すなわち、改変タンパク質(F103V)はN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素であることが明らかとなった。

[0032] 実施例4 N-メチルバリンオキシダーゼを用いたN-メチルバリンの測定
検体中のN-メチルバリン濃度を、下記試薬を用いて下記測定法により測定した。

[発明の効果] 本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を蛋白工学的手法を用いて改変し、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素を供給することが可能となった。本発明のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素は、検体中のN-メチルバリン濃度の測定に使用することができる。

[0035]

[配列]

配列番号: 1

配列の長さ: 389

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

(5)

特開平7-170976

9

10

生物名：アースロバクター・エスピー(Arthrobacter S * 案名: TE 1826

P.)

*

配列

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
 20 25 30
 Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
 35 40 45
 Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
 50 55 60
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 100 105 110
 Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
 115 120 125
 Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
 130 135 140
 Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 165 170 175
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 Arg Gln Val Val Gly Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
 305 310 315 320
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
 325 330 335
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys

BEST AVAILABLE COPY

(7)

特開平7-170976

11

370 375

Gln Lys Glu Thr Ile
385

12

380

* 特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: -10 signal

存在位置: 237..242

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 298..1464

10 特徴を決定した方法: P

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 301..1464

特徴を決定した方法: E

他の情報: ベルコシンオキダーゼ活性を有する蛋白質を
コードする遺伝子。

【0036】配列番号: 2

配列の長さ: 1670

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic cDNA

起源:

生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter s
p.)

株名: TE 1826

配列の特徴:

特徴を表す記号: -35 signal

存在位置: 114..119

*

配列

CTGGAGTCT TCCCTCAGCT TTTCATCTT CACCGTAACA TAAGATTGAA CATAATTAA 50

ACTTTGGCCG CCCTTTGAAA CCTCTCCATA TTCAACTACCT TTTCGAAAAA TCTGCAAATC 129

TTTAATTTCG AAGTATAATC ACTCCCCAAA CGTTCTTTA CTACTAACAC TAGAATATT 180

CTAAAAGTGA TAGCTGTAT CACTTTAACG CATTTCATAC GATGCCAT AGGGCGTATG 240

ATGTAATAG ATAATTAGA AAATTCAAT TACCTGTITG AAAAAGGAGA CGAAACA 297

ATG AGT ATT AAA AAA CAT TAT GAT GTA ATT GTG GTT GCC CCT GGT TCC 345

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

1 5 10 15

ATG GCA ATG GCA GCT GGG TAC TAT CTG TCT AAA CAA GGT GTT AAA ACA 393

Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr

20 25 30

CTA TTG GCA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT GCC AGC CAT CAT 441

Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His

35 40 45

GCC GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GCC GAA GGA AGA GAG TAT 489

Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr

50 55 60

GTA CGG TTT GCC TTG AGA GCA CAA GAG TTA TGG TAT GAA TTA GAA AAG 537

Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys

65 70 75

CAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA GGT GTA CTC GTT TTT GGT 585

Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly

85 90 95

CCT AAA GGA GAA GCT CCT TTC GTT CCC GAA ACA ATG GAA GCC GCA AAG 633

Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys

100 105 110

CAA CAT TCA TTA CAT GTT CAT TTA CTA GAA GGA ACT GAA ATA AAT AAG 681

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys

115 120 125

CGT TGC CCA GGT GYA AGG GTT CCT GAG AAT TAT AAT GCT ATT TTT GAA 729

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu

130 135 140

AAA AAT TCT GGT GTC TTA TTT ACT GAA AAT TGT ATT CGC CCT TAC GGT 777

BEST AVAILABLE COPY

13

14

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 CAA TTG CGG GAA GCA AAT CGT CGG AAA GTT CTA ATC TAC ACA CCC GTT 825
 Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 165 170 175
 CAA GAT TTC GAG ATT CGC GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC CCC TAT 873
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 CGC TCC TTT ACA GCC AGT AAA TTA ATT CGT AGC ATG GGC GCT TGG AAT 921
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 AGC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT CAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC 959
 Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 CGT CAA GTT GTC GGA TTC TTC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT ACC AAT 1017
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 ACA CAT CGT TAT CGG CGG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GCC ATC TAT 1065
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 TAC GGA TTT CCA ACC TTC GGC TGC GGC TTG AAA ATA CGC TAT CAT 1113
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 AGC TAT CGT CAA AAA ATC CAT CCA GAT ACC ATT AAT CGT GAA TTT CGT 1161
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 ATT TAC CGG GAG CAT CAA CGG AAT ATT CGC AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 ATG CGG GCA GCA ACC CGC GAA TTA AAA AGT CGG GCA GTT TGC ATG TAC 1257
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
 305 310 315 320
 ACA AAA ACA CCT GAT CGG CAT TTC GTG ATT GAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
 325 330 335
 TCG AAT GTC CGG ATT GCA CGG CGA TTC TCC CGA CAT CGG TTT AAA TTC 1353
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350
 TCA AGC GTC GTT CGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA CCT GTC GCA ACC CGT AAA 1401
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365
 ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CGC CCT CCT TTA AAA 1449
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 370 375 380
 Gln Lys Glu Thr Ile
 385
 TATGTACCGC TTACTTTATT TAGAACCTAA AAATCTGGAT ATCAATCTG TCCCTCTACT 1564
 GATTGAAGCA CAAACTGTAC TTGAAGGGT TTTTTATTA CTTGTAACGA TAACAGGAAC 1524
 CCTAAAATAA GAAGACCGCT GCTAAAGAAT AGTACCGGAG GATTC 1570

BEST AVAILABLE COPY

(9)

特開平7-170976

15

16

【0037】配列番号：3

配列の長さ：39

配列の型：核酸(DNA)

配列

GCTCC TAAAG GAGAA CCTCC TGTGG TTGCC GAAAC AATG 39

【図面の簡単な説明】

* 鎖の数：一本鎖

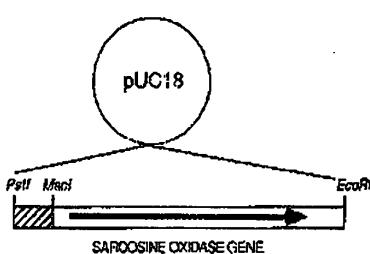
トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

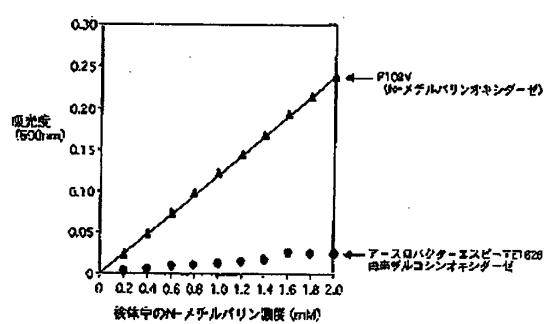
【図1】プラスミド、pSAOEP3-F103V の構造を示す。※

※ 【図2】N-メチルバリン測定の希釈直線性を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.*

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C12R 1:19)

(C12N 1/21

C12R 1:19)

BEST AVAILABLE COPY